



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262317

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 31/22

(22) Přihlášeno 10 01 86

(21) PV 227-86.E

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSC., MALÝ MILAN RNDr., BRNO

(54) Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas obsahující kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou

Činidlo s kyselinou pyridoxal-5-fosforečnou pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas obsahuje kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou, tris-(hydroxymetyl)aminomethan, neutrální tensidy, např. polyetylglykol nebo ethoxylovaný oleylalkohol, neutrální plnidlo, např. chlorid sodný nebo draselný, laktosu, maltosu, dextran. Roztok připravený z tohoto činidla je stálý několik měsíců při teplotě +2 až +8 °C.

Vynález se týká činidla pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas obsahujícího kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou.

Stanovení katalytické koncentrace aminotransferas v krevním séru nebo plasmě je velmi cennou analýsou umožňující značné zpřesnění diferenciální diagnostiky jaterních a ischemických srdečních chorob. Proto se stalo od svého zavedení do klinické praxe jednou z nejčastěji prováděných analýs v klinické biochemii.

Práce zveřejněné v posledních deseti letech jednoznačně potvrzují, že kyselina pyridoxal-5-fosforečná je koenzymem aminotransferas. Hladina endogenní kyseliny pyridoxal-5-fosforečné je dosti variabilní a často je pod fyziologickou koncentrací. Proto je nutné reakční směs saturovat přísadkou kyseliny pyridoxal-5-fosforečné. Tento způsob stanovení katalytické koncentrace aminotransferas je též doporučován i v referenční metodě Mezinárodní federace klinické biochemie.

V řadě případů lze naopak z katalytické koncentrace aminotransferas stanovených v přítomnosti přebytku exogenní kyseliny pyridoxal-5-fosforečné usuzovat i na deficit endogenní kyseliny pyridoxal-5-fosforečné. Tato hodnota nabývá též stále většího klinického významu.

V současné době se pracovní roztok připraví tak, že k pufrovanému roztoku substrátu se přidá kyselina pyridoxal-5-fosforečná. Tím dojde k výraznému snížení stability zásobního roztoku pufru asi na jednu třetinu původní doby. Tento nedostatek může být odstraněn, připraví-li se mnohonásobně koncentrovaný roztok kyseliny pyridoxal-5-fosforečné, který se těsně před použitím přidá do reakční směsi. Avšak kyselina pyridoxal-5-fosforečná je ve vodných roztocích nejen velmi málo rozpustná, ale i omezeně stálá. Rozpustnost kyseliny pyridoxal-5-fosforečné se může snadno zvýšit, upraví-li se pH alkálií na hodnotu vyšší než 6,5. Ukázalo se, že běžné alkálie jako jsou hydroxid sodný a uhličitán sodný katalyticky urychlují rozklad kyseliny pyridoxal-5-fosforečné. Proto je nutné vybrat takovou substanci, která nastaví pH na požadovanou hodnotu, která bude působit katalytický rozklad a která též bude kompatibilní s biochemickým analyzovaným systémem.

Zmíněné nedostatky podstatně snižuje činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas obsahující kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou jehož podstata spočívá v tom, že na 1 mmol kyseliny pyridoxal-5-fosforečné obsahuje 0,5 až 10 mmol tris(hydroxymetyl)-aminometanu, 0,01 až 1,5 g neutrálního tensidu, např. polyetylen glykolu nebo ethoxylovaného oleylaikoholu a 0,35 až 60 g neutrálního plnidla, např. chloridu sodného nebo draselného, laktosu, maltosu nebo dextran. Činidlo je možné připravit též jako vodný roztok s 0,55 až 111 moly vody.

Činidlo s kyselinou pyridoxal-5-fosforečnou podle vynálezu má následující přednosti. Tris(hydroxymetyl)aminometan působí současně jako alkálie převádějící obtížně rozpustnou kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou na dobře rozpustnou sůl a má specifickou vlastnost, že na rozdíl od jiných, běžných alkálií, zvyšuje stabilitu roztoku činidla. V roztocích s kyselinou pyridoxal-5-fosforečnou připravených neutralizací běžnými alkáliemi, např. uhličitánem sodným, po 4 týdnech bylo nalezeno pouze 10 % původního obsahu účinné látky. Oproti tomu v roztoku obsahujícím tris(hydroxymetyl)aminometan bylo nalezeno 95 % kyseliny pyridoxal-5-fosforečné.

Tris(hydroxymetyl)aminometan je současně kompatibilní s analytickými systémy nejčastěji užívanými pro stanovení katalytické aktivity aminotransferáz.

P ř í k l a d 1

Z 1 mmolu kyseliny pyridoxal-5-fosforečné nebo její soli, 0,5 mmol tris(hydroxymetyl)-aminometanu, 0,01 g polyetylen glykolu a 0,35 g chloridu sodného se připraví homogenní směs.

P ř í k l a d 2

Ve 20 ml destilované vody se rozpustí 0,1 mmol kyseliny pyridoxal-5-fosforečné, 1 mmol tris(hydroxymetyl)aminometanu, 6 g chloridu draselného, 1 g ethoxylovaného oleylalkoholu.

P ř í k l a d 3

K 1 ml reakční směsi obsahující 122 mmol.l^{-1} tris(hydroxymetyl)aminometanu, 244 mmol.l^{-1} kyseliny L-asparagové, $0,20 \text{ mmol.l}^{-1}$ nikotinamidadenindinukleotid, $7,6 \text{ ukat.l}^{-1}$ malátdehydrogenasy, 11 ukat.l^{-1} laktátdehydrogenasy se přidá 20 μl roztoku činidla s kyselinou pyridoxal-5-fosforečnou připraveného dle příkladu 2 a 100 μl analysovaného séra. Po 10 minutách preinkubace při 30°C je enzymová reakce nastartována 100 μl kyseliny 2-oxoglutarové o koncentraci 144 mmol.l^{-1} . Zaznamenává se změna absorbance při 340 nm za časovou jednotku při 30°C .

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas obsahující kyselinu pyridoxal-5-fosforečnou vyznačené tím, že na 1 mmol kyseliny pyridoxal-5-fosforečné obsahuje 0,5 g až 10 mmol tris(hydroxymetyl)aminometanu, 0,01 až 1,5 g neutrálního tensidu, například polyetylglykolu nebo etoxylovaného oleylalkoholu a 0,35 až 60 g neutrálního plnidla, například chloridu sodného nebo draselného, laktosu, maltosu nebo dextran.

2. Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aminotransferas podle bodu 1 vyznačené tím, že obsahuje 0,55 až 111 molů vody.